

## 明 細 書

## 骨形成促進及び／又は骨吸収抑制剤

## 〔技術分野〕

本発明は、 $\beta_2$ ミクログロブリン、ヒストン、補体第3成分、単球走化性タンパク質1、リゾチーム、リボヌクレアーゼ、プロトロンビン、チトクローム P-450、プラスミノーゲン、トランスフェリン、トロンビン、プラスミン、補体第4成分、 $\beta$ デフェンシン及びこれらの酵素分解物のいずれか1種以上を有効成分とする骨形成促進及び／又は骨吸収抑制剤に関する。また、本発明は、 $\beta_2$ ミクログロブリン、ヒストン、補体第3成分、単球走化性タンパク質1、リゾチーム、リボヌクレアーゼ、プロトロンビン、チトクローム P-450、プラスミノーゲン、トランスフェリン、トロンビン、プラスミン、補体第4成分、 $\beta$ デフェンシン、及びこれらの酵素分解物のいずれか1種以上を配合した骨形成促進及び／又は骨吸収抑制剤、さらには骨形成促進及び／又は骨吸収抑制用飲食品、医薬又は飼料に関する。

## 〔背景技術〕

近年、高齢者人口の増加に伴い、骨粗鬆症、骨折、腰痛等の各種骨疾患が増加する傾向にある。骨組織においては、絶えず骨形成と骨吸収が営まれており、若い時には骨形成と骨吸収のバランスが保たれているが、加齢に伴い種々の原因でそのバランスが骨吸収に傾く（アンカッピング）。そして、この状態が長期間続くと骨組織が脆くなり、骨粗鬆症、骨折、腰痛等の各種骨疾患を生じることになる。このアンカッピングを防止することができれば、骨粗鬆症、骨折、腰痛等の各種骨疾患を予防することができると考えられている。

従来より、アンカッピングを防止し、各種骨疾患を予防あるいは治療する方法として、（1）食餌によるカルシウム補給、（2）軽い運動、（3）日光浴、（4）薬物治療等が行われている。食餌によるカルシウム補給には、炭酸カルシウム、リン酸カルシウム等のカルシウム塩や卵殻、魚骨粉等の天然カルシウム剤が使用されている。しかし、これらは必ずしも経口摂取に適している素材であるとはいえない。

軽い運動はジョギングや散歩等が良いとされるが、体が弱っている場合は軽い運動も厄介なものであり、まして寝たきりの老人では殆ど運動できない。日光浴は活性型ビタミンD3の補給という点では良いとされているが、これだけでは不十分である。薬物投与には、 $1\alpha$ -ヒドロキシビタミンD3やカルシトニン製剤等が使用されており、骨粗鬆症の治療には有効であるということが知られている。しかし、これらの物質は医薬そのものであり、食品素材としても使用可能なものではない。

破骨細胞は造血幹細胞から発生して海綿骨表面に存在し、骨を溶解する細胞である。また、骨芽細胞は骨組織表面に存在し、盛んにコラーゲンなどの骨基質タンパク質を合成している骨形成で中心的な役割を果たしている細胞である。この骨基質タンパク質にリン酸カルシウム、ヒドロキシアパタイトの結晶が沈着し(石灰化)、硬い骨組織ができあがる。

破骨細胞が骨基質を溶解し(骨吸収)、その後、骨芽細胞が骨基質を合成する(骨形成)ことによって、骨の形成や成長(モデリング)、代謝(リモデリング)が起こると考えられている。

本発明者らは、食品素材として使用可能な骨形成促進作用や骨吸収抑制作用を有する物質を得るために、乳清タンパク質中に存在する骨形成促進因子及び骨吸収抑制因子を探索し続けてきた。その結果、逆浸透膜や電気透析等の処理により、乳清タンパク質の水溶性画分から乳清由来の塩を除去したタンパク質及びペプチド混合物に骨強化作用があることを見出した(特開平 4-183371 号公報)。そして、このタンパク質及びペプチド混合物の水溶液をエタノール処理、加熱処理、加塩処理、限外濾過膜処理して得られる画分に骨芽細胞増殖促進作用及び骨強化作用があることを見出した(例えば、特開平 5-176715 号公報及び特開平 5-320066 号公報)。また、乳中に微量にしか存在しない塩基性タンパク質に骨芽細胞増殖促進作用、骨強化作用及び骨吸収抑制作用があることを見出した(特開平 8-151331 号公報)。

本発明者らは、更に探索を進め、骨形成促進及び骨吸収抑制作用を有する活性本体の分離精製を試み、その物質を同定したところ、既知物質である、 $\beta_2$ ミクログロブリン、ヒストン、補体第3成分、単球走化性タンパク質1、リゾチーム、

リボヌクレアーゼ、プロトロンビン、チトクローム P-450、プラスミノーゲン、トランスフェリン、トロンビン、プラスミン、及びこれらの酵素分解物によって、破骨細胞による骨吸収が顕著に抑制されることを見出した。

また、プロトロンビン、チトクローム P-450、プラスミノーゲン、トランスフェリン、トロンビン、プラスミン、及びこれらの酵素分解物によって、破骨細胞による骨吸収が顕著に抑制されるとともに骨芽細胞の増殖を促進することにより骨形成が促進されることを見出した。

さらに、補体第4成分、 $\beta$ デフェンシン、及びこれらの酵素分解物によって、骨芽細胞の分化を促進することにより骨形成が促進されることを見出し、本発明を完成するに至った。

$\beta_2$ ミクログロブリン ( $\beta_2$  - Microglobulin) は、分子量約 11.6kDa のタンパク質であり、主要組織適合複合体 (MHC) の構成成分である。血液を始め、全身組織中に広く分布していることが知られており、ヒトやウシでは乳中にも存在していることが報告されている。 $\beta_2$ ミクログロブリンの骨への作用については、骨代謝回転のマーカーとして、高回転型骨粗鬆症では血中  $\beta_2$ ミクログロブリン濃度が高くなるとの報告がされている (ジェイ・エム・クエサダ (J. M. Quesada) 外 6 名, 「高年女性の高骨リモデリングのマーカーとしての血清  $\beta_2$ ミクログロブリン」、メカニズムス・オブ・エージング・アンド・ディベロプメント、(米国) 1998 年、102 号、p. 293-298)。また、培養骨芽細胞 MC3T3 の増殖を促進したことから、 $\beta_2$ ミクログロブリンは骨形成を促進するとの報告がある (イー・バリント (E. Balint) 外 2 名, 「 $\beta_2$ ミクログロブリンが誘発する骨からのミネラル溶出におけるインターロイキン 6 の役割」、キドニー・インターナショナル、(米国)、2000 年、57 号、p. 1599-1607)。一方、骨吸収作用に関しては、 $\beta_2$ ミクログロブリンが骨からのカルシウム溶出を促進するとの報告がある (ジェイ・ピーターセン (J. Petersen) 外 1 名, 「 $\beta_2$ ミクログロブリンの骨吸収におけるインビボ効果」、アメリカン・ジャーナル・オブ・キドニー・ディズィーズ、(米国)、1994 年、23 号、p. 726-730)。しかし、カルシウム溶出を促進する作用と骨吸収を抑制する作用とは異なっており、本発明者らが見出したような  $\beta_2$ ミクログロブリンが骨吸収を抑制する作用について記載した文献は見られない。

ヒストン (Histone) は、高等動物の細胞核中に存在する塩基性タンパク質である。高等動物の場合、遺伝子情報をつかさどる DNA (デオキシリボ核酸) は直線距離で約 2m の長さがあると言われているが、その DNA を細胞核中に効率よく収納するために必須なタンパク質である。すなわち、DNA はヒストンに巻き付いた状態で機能的に折り畳まれている。通常、H1、H2A、H2B、H3、H4 の 5 分子種からなり、H2A、H2B、H3、H4 各 2 分子ずつ計 8 分子で一つの集合体を形成する。その集合体に DNA が巻き付き、クロマチンと呼ばれる単位を形成する。H1 はクロマチン同士を接着させる働きを担っている。このようにヒストンと DNA は常にセットであり、重量比でほぼ 1:1 の割合で核内に存在している。これまで DNA については、核酸及びその構成成分として栄養効果に関する報告が数多く行われ、核酸は第 6 の必須栄養素ではないかとの考え方もある。しかし、それと対をなして存在するヒストンについては、栄養効果を報告した例はない。動物性の食物は基本的に細胞の集合体である。よって食物を摂る以上、ヒストンは動物の種類に関係なく必然的に摂取することになるタンパク質である。しかしヒトの場合、白米や小麦粉、砂糖等のように、精製され、細胞核を含まない食素材を用いた無細胞食品を摂取する場合が極めて多い。ヒストンの骨吸収抑制作用だけを期待するならば、細胞の塊である肝臓や白子等の食素材を多く食事に取り入れればよいが、味覚的、また食品加工上の問題が大きく、制約が極めて大きい。

補体 (Complement component) は、血清中にあり、抗原抗体複合物と反応して活性化され、複雑な反応を起こしながら生理活性を発揮する酵素様物質である。現在、C1 から C9 までの九つの成分が知られている。Complement component 3 は C3 にあたるもので補体第 3 成分と呼ばれ、補体成分の中でもっとも含有量が多い。その構造は分子量 10.5 万の  $\alpha$  鎖と分子量 7.5 万の  $\beta$  鎖が 2 箇所の S-S 結合で架橋された糖たんぱく質である。この分子量 18 万の C3 は、C3 転換酵素によって、 $\alpha$  鎖の一部が分解されてできた分子量 9,000 の C3a と、2 箇所の S-S 結合を含む残りの分子量 17 万の C3b に分かれる。C3a は肥満細胞を刺激してヒスタミン放出を促進する等、炎症反応を惹起する代表的なアナフィラトキシンの一つとして知られている。C3b はさらに C3 転換酵素により分解され、その一部が抗原抗体複合物と共有結合する。血液中のマクロファージ等の食細胞は細胞表面に C3b レセプタ

一を有しているため、結果的にこの反応は食細胞による異物の貪食を亢進する。このように補体第3成分(C3)は免疫反応に深く関与する物質である。この他に補体第3成分を有効成分として含有する胚・胎児及びそれらの組織培養用栄養因子組成物や不妊症治療用組成物が公開されている(特開平10-033164号公報)。補体第3成分は自己組織である骨組織を分解していく機能を有する破骨細胞に対しては、逆にその活性を抑制する役割を果たすことが本発明によって明らかとなった。

単球走化性タンパク質-1(Monocyte chemotactic protein-1 或いは Monocyte chemoattractant protein-1、MCP-1)は単球や血管内皮、グリオーマ細胞株等が産生する単球走化性因子である。RANTES(regulated on activation, normal T cell expressed and secreted)とともに代表的なC-Cケモカインファミリーの一つで、分子量は8,000~18,000、76アミノ酸からなる。主として単球に走化性を示し、好中球やリンパ球には作用しない。

リゾチーム(Lysozyme)は細菌細胞壁のムコペプチド等に存在するN-アセチルムラミン酸とN-アセチルグルコサミンの間の $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4結合を加水分解する酵素であり、動植物界に広く分布している。基質特異性や分子量から4つのグループに分けられる。

リボヌクレアーゼ(Ribonuclease)は核酸の一種であるリボ核酸(RNA)に作用して、モノヌクレオチド或いはオリゴヌクレオチドを生じる酵素の総称である。

プロトロンビン(Prothrombin)は、分子量約7.2kDaのタンパク質であり、血液凝固II因子とも呼ばれる。ビタミンK依存性血液凝固因子の1つであり、ビタミンK存在下で第X因子によりトロンビンに分解される。生じたトロンビンはフィブリノーゲンをフィブリンへと分解し、フィブリンが架橋することによって血液が凝固する。プロトロンビンは、血液を始め、全身組織中に広く分布していることが知られており、ヒトやウシでは乳中にも存在していることが報告されている。

トロンビン(Thrombin)は前述のようにプロトロンビンを第X因子等の酵素で分解したものである。

チトクロームP-450(Cytochrome P-450)は、還元型で一酸化炭素を結合して450nm付近にソーレー吸収帯を示す一群のプロトヘムタンパク質の総称である。

機能的には、各種のステロイドホルモン、胆汁酸、プロスタノイドの合成・分解反応、脂肪酸の $\omega$ 酸化、ビタミンDの活性化反応、無数の外来薬物や体内に取り込まれた環境汚染物質等の酸化分解反応に関与している。

プラスミノゲン(Plasminogen)は、プラスミンの前駆体であり、動物血漿中に存在し、プラスミノゲンアクチベーターによって分子内の Arg-Val 結合が切断されて活性なプラスミンとなる。分子量約 91,000 の一本鎖の糖タンパク質であり、プラスミン等のプロテアーゼによってN末端側のペプチドが切断されて分子量約 82,000 の修飾プラスミノゲンとなる。

プラスミン(Plasmin)は、このようにプラスミノゲンをプラスミノゲンアクチベーター等の酵素で分解したものである。

トランスフェリン(Transferrin)は、血中の輸送鉄と結合する分子量約 75,000 のタンパク質で、鉄結合性グロブリンとも呼ばれる。幼若赤血球はトランスフェリンと結合した鉄に対する受容体を有しており、血清鉄がヘモグロビンの合成に利用されるためにはトランスフェリンと結合していなければならない。トランスフェリンについては膜結合型トランスフェリン様蛋白質が軟骨細胞の形成を促進すると開示されているが、軟骨細胞の形成促進であり、骨形成促進とはメカニズムは全く異なっている（特開2002-20311号公報及び再公表特許W001/013951号公報）。

補体第4成分(Complement component C4)は血清中にあり、抗原抗体複合物と反応して活性化され、複雑な反応を起こしながら生理活性を発揮する酵素様物質である。補体第4成分自体では抗原に対する特異性は持たないが、抗原抗体複合物により活性化され、貪食作用の亢進を起こしたり、特異抗体の結合した細胞や細菌を破壊したりする。補体第4成分は、 $\alpha$ 鎖、 $\beta$ 鎖、 $\gamma$ 鎖という3種類のポリペプチド鎖からなる分子量210 kDaのタンパク質である。補体第4成分が骨芽細胞の分化を促進することに関しては知られていなかった。

デフェンシン(Defensin)は、分子内に3つのS-S結合をもつ強い塩基性の抗菌ペプチドとして知られており、アルギニン残基が4~10個、システイン残基が6個ある29~34個のアミノ酸からなる塩基性のタンパク質である。システイン残基の存在位置の違いから、大きく $\alpha$ 型と $\beta$ 型に分けられる。グラム陽性細菌およ

びグラム陰性細菌に対する抗菌活性だけではなく、カビやウィルスに対しても抗菌活性を保有する。 $\beta$ デフェンシンは、呼吸器系上皮細胞や粘膜上皮細胞で発現しており、ヒトにおいては6つのタイプが知られている。デフェンシンには、抗菌作用のほか、正常細胞や癌細胞に対する細胞傷害作用、肥満細胞からのヒスタミン放出作用、単球走化作用など広く生体防御に関係していることが知られている。酵母と乳酸菌の特定の培養液濾液を投与してデフェンシン等を分泌させることからなるレトロウィルス感染症治療薬（特開 2004-115497 号公報）や、皮膚におけるデフェンシンの発現を刺激するヨモギの根からなる化粧用組成物などが公開されている（特開 2004-067660 号公報）が、骨芽細胞の分化を促進することに関しては知られていなかった。

これらの骨形成促進作用及び骨吸収抑制作用を有する物質のうち、 $\beta_2$ ミクログロブリンについては前記したように、骨からのカルシウム溶出を促進するなどの報告がある。しかし、これも前記したように、カルシウム溶出を促進する作用と骨吸収を抑制する作用とは異なっており、本発明者らが見出したような $\beta_2$ ミクログロブリンが骨吸収を抑制する作用について記載した文献は見られない。 $\beta_2$ ミクログロブリン以外のヒストン、補体第3成分、単球走化性タンパク質1、リゾチーム、リボヌクレアーゼ、プロトロンビン、チトクローム P-450、プラスミノゲン、トランスフェリン、トロンビン、プラスミン、補体第4成分、 $\beta$ デフェンシン、及びこれらの酵素分解物のいずれについても骨形成促進や骨吸収を抑制する働きについて記載した文献は見られない。

[発明の開示]

[発明が解決しようとする課題]

本発明は、骨粗鬆症、骨折、腰痛等の各種骨疾患の性質上、日常の食事の中で、嗜好的にも問題なく、長期的・直接的に経口摂取することができ、また、直接的に骨形成促進及び骨吸収抑制作用を骨に付与し、骨粗鬆症、骨折、腰痛等の各種骨疾患の予防又は改善治療効果が期待できるような、新規な骨形成促進及び骨吸収抑制剤、さらには骨形成促進及び骨吸収抑制用飲食品、医薬又は飼料を提供することを課題とする。

[課題を解決するための手段]

本発明者らは、これらの問題点を鑑み、広く食品素材に含まれている骨強化作用を示す物質について、鋭意、探索を進め、骨形成促進作用及び骨吸収抑制作用を有するタンパク質について、骨形成促進及び骨吸収抑制作用を有する成分の分離精製を試み、その物質を同定したところ、既知物質である $\beta_2$ ミクログロブリン、ヒストン、補体第3成分、単球走化性タンパク質1、リゾチーム、リボヌクレアーゼ、プロトロンビン、チトクローム P-450、プラスミノーゲン、トランスフェリン、トロンビン、プラスミン、及びこれらの酵素分解物が、破骨細胞による骨吸収を顕著に抑制すること、また、プロトロンビン、チトクローム P-450、プラスミノーゲン、トランスフェリン、トロンビン、プラスミン、及びこれらの酵素分解物が、破骨細胞による骨吸収を顕著に抑制するとともに骨芽細胞の増殖を促進することにより骨形成を促進すること、さらに、補体第4成分、 $\beta$ デフェンシン、及びこれらの酵素分解物が、骨芽細胞の分化を促進することにより骨形成を促進することを見出した。

そして、これらの物質を骨形成促進及び／又は骨吸収抑制剤として利用することができることを見出し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、 $\beta_2$ ミクログロブリン、ヒストン、補体第3成分、単球走化性タンパク質1、リゾチーム、リボヌクレアーゼ、プロトロンビン、チトクローム P-450、プラスミノーゲン、トランスフェリン、トロンビン、プラスミン、補体第4成分、 $\beta$ デフェンシン、及びこれらの酵素分解物のいずれか1種以上を有効成分とする骨形成促進及び／又は骨吸収抑制剤に関する。

また、本発明は、 $\beta_2$ ミクログロブリン、ヒストン、補体第3成分、単球走化性タンパク質1、リゾチーム、リボヌクレアーゼ、プロトロンビン、チトクローム P-450、プラスミノーゲン、トランスフェリン、トロンビン、プラスミン、補体第4成分、 $\beta$ デフェンシン、及びこれらの酵素分解物のいずれか1種以上を配合した骨形成促進及び／又は骨吸収抑制用飲食品、医薬又は飼料に関する。

#### [発明の効果]

本発明の $\beta_2$ ミクログロブリン、ヒストン、補体第3成分、単球走化性タンパク質1、リゾチーム、リボヌクレアーゼ、プロトロンビン、チトクローム P-450、プラスミノーゲン、トランスフェリン、トロンビン、プラスミン、補体第4成分、



$\beta$  デフェンシン、及びこれらの酵素分解物のいずれか 1 種以上を有効成分とする骨形成促進及び／又は骨吸収抑制剤は、これを経口投与することにより、骨粗鬆症等の各種骨疾患の予防や改善に有用である。また、これらの有効成分を飲食品、医薬、飼料等に配合すると、骨形成を促進し、あるいは骨吸収を抑制して骨粗鬆症等の各種骨疾患を予防し、改善する効果を奏する。

〔発明を実施するための最良の形態〕

本発明は、 $\beta_2$  ミクログロブリン、ヒストン、補体第 3 成分、単球走化性タンパク質 1、リゾチーム、リボヌクレアーゼ、プロトロンビン、チトクローム P-450、プラスミノーゲン、トランスフェリン、トロンビン、プラスミン、及びこれらの酵素分解物のいずれか 1 種以上を配合することによって、破骨細胞による骨吸収が抑制される骨吸収抑制剤である。

また、本発明は、プロトロンビン、チトクローム P-450、プラスミノーゲン、トランスフェリン、トロンビン、プラスミン、及びこれらの酵素分解物のいずれか 1 種以上を配合することによって、破骨細胞による骨吸収が顕著に抑制されるとともに骨芽細胞の増殖が促進される骨形成促進及び骨吸収抑制剤である。

さらに、本発明は、補体第 4 成分、 $\beta$  デフェンシン、及びこれらの酵素分解物のいずれか 1 種以上を配合することによって、骨芽細胞の分化が促進される骨形成促進剤である。

$\beta_2$  ミクログロブリン、ヒストン、補体第 3 成分、単球走化性タンパク質 1、リゾチーム、リボヌクレアーゼ、プロトロンビン、チトクローム P-450、プラスミノーゲン、トランスフェリン、トロンビン、プラスミン、補体第 4 成分、 $\beta$  デフェンシン、及びこれらの酵素分解物に見出された骨形成促進及び／又は骨吸収抑制作用を用いることによって、骨代謝を骨形成優位のバランスへ傾けることが期待できる。よって本発明は、骨形成促進及び骨吸収抑制作用を有する骨形成促進及び／又は骨吸収抑制剤、骨形成促進及び／又は骨吸収抑制用飲食品、医薬又は飼料を提供することができる。

本発明において骨形成促進及び／又は骨吸収抑制の有効成分として使用する  $\beta_2$  ミクログロブリン、ヒストン、補体第 3 成分、単球走化性タンパク質 1、リゾチーム、リボヌクレアーゼ、プロトロンビン、チトクローム P-450、プラスミノー

ーゲン、トランスフェリン、トロンビン、プラスミン、補体第4成分及び $\beta$ デフェンシンはいずれもウシ、水牛、ヒト、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ウマ等の乳中にも微量に存在しており、乳から分離抽出が可能である。乳成分としては、生乳、脱脂乳、又はホエーから分離したタンパク質画分、あるいは生乳から分離した乳中の細胞画分が利用できる。 $\beta_2$ ミクログロブリン、補体第3成分、単球走化性タンパク質1、プロトロンビン、チトクローム P-450、プラスミノーゲン、トランスフェリン、トロンビン、プラスミン、補体第4成分、及び $\beta$ デフェンシンは健康な家畜の血液から調製することもできる。ヒストンを抽出する素材としては、乳成分のほかに、穀物胚芽、白子等を利用することができる。穀物胚芽は小麦胚芽、米胚芽等が利用できる。白子はサケ、マス、タラ、ニシン、イカ、ホタテ貝等の魚介類から採取されたものを用いれば良いが、特に、サケ、マス、タラ等の漁獲量の多い魚類の白子を用いることが、資源の有効利用の面から好ましいといえる。

$\beta_2$ ミクログロブリン、ヒストン、補体第3成分、単球走化性タンパク質1、リゾチーム、リボヌクレアーゼ、プロトロンビン、チトクローム P-450、プラスミノーゲン、トランスフェリン、トロンビン、プラスミン、補体第4成分、 $\beta$ デフェンシンはいずれも市販されており、この市販品を用いることも可能である。また、遺伝子工学的に作製したリコンビナント品を用いても良い。

さらに、 $\beta_2$ ミクログロブリン、ヒストン、補体第3成分、単球走化性タンパク質1、リゾチーム、リボヌクレアーゼ、プロトロンビン、チトクローム P-450、プラスミノーゲン、トランスフェリン、トロンビン、プラスミン、補体第4成分、 $\beta$ デフェンシンを、トリプシン、パンクレアチン、キモトリプシン、ペプシン、パパイン、カリクレイン、カテプシン、サーモライシン、V8プロテアーゼ等のタンパク質分解酵素により分解したものを用いても良い。例えば、プロトロンビン分解物は、上記のプロトロンビンをタンパク質分解酵素で限定分解したペプチド混合物である。プロトロンビンをファクターX等の酵素で分解したトロンビンを用いても良い。また、プラスミノーゲンをプラスミノーゲンアクチベーター等の酵素で分解したプラスミンを用いても良い。トロンビン、プラスミンもプロトロンビン、プラスミノーゲンと同様に市販されており、この市販のものを用いる

こともできる。

乳からの調製については、例えば、新鮮な牛乳をイオン交換樹脂に接触させて  $\beta_2$  ミクログロブリン、ヒストン、補体第3成分、単球走化性タンパク質1、リゾチーム、リボヌクレアーゼ、プロトロンビン、チトクローム P-450、プラスミノゲン、トランスフェリン、トロンビン、プラスミン、補体第4成分、 $\beta$  デフェンシンを含む画分を吸着させ、塩化ナトリウムの濃度を徐々に高めて溶出した後、ゲル濾過クロマトグラフィーによりそれぞれ得ることができる。

血液からの調製については、クエン酸血漿をクエン酸バリウムと反応させ、不溶性バリウムに吸着した  $\beta_2$  ミクログロブリン、ヒストン、補体第3成分、単球走化性タンパク質1、リゾチーム、リボヌクレアーゼ、プロトロンビン、チトクローム P-450、プラスミノゲン、トランスフェリン、トロンビン、プラスミン、補体第4成分、 $\beta$  デフェンシンの沈殿をそれぞれ回収する。さらにイオン交換クロマトグラフィーにより純度を高めることができる。

本発明の骨形成促進及び／又は骨吸収抑制剤は、 $\beta_2$  ミクログロブリン、ヒストン、補体第3成分、単球走化性タンパク質1、リゾチーム、リボヌクレアーゼ、プロトロンビン、チトクローム P-450、プラスミノゲン、トランスフェリン、トロンビン、プラスミン、補体第4成分、 $\beta$  デフェンシン、及びこれらの酵素分解物のいずれか1種以上を有効成分とする。また、この  $\beta_2$  ミクログロブリン、ヒストン、補体第3成分、単球走化性タンパク質1、リゾチーム、リボヌクレアーゼ、プロトロンビン、チトクローム P-450、プラスミノゲン、トランスフェリン、トロンビン、プラスミン、補体第4成分、 $\beta$  デフェンシン、及びこれらの酵素分解物のいずれか1種以上を、牛乳、乳飲料、コーヒー飲料、ジュース、ゼリー、ビスケット、パン、麺、ソーセージ等の飲食品に配合しても良いし、錠剤や粉末等の医薬としても良い。さらに、塩化カルシウム、炭酸カルシウム、乳酸カルシウム、卵殻、牛乳由来のカルシウム等の吸収性が良好なカルシウム剤を併用し、骨代謝を骨形成優位のバランスへ傾けることにより、骨強化作用を一層高めることもできる。

本発明の骨形成促進及び／又は骨吸収抑制剤の投与量は、有効成分、年齢、治療効果及び病態等により異なるが、成人の場合、1日当たり 1ng~1g を数回に分

けて経口的に摂取すれば良い。このように、本発明の骨形成促進及び／又は骨吸収抑制剤を摂取することにより、骨粗鬆症等の各種骨疾患を予防することができる。なお、 $\beta_2$ ミクログロブリン、ヒストン、補体第3成分、単球走化性タンパク質1、リゾチーム、リボヌクレアーゼ、プロトロンビン、チトクローム P-450、プラスミノゲン、トランスフェリン、トロンビン、プラスミン、補体第4成分、 $\beta$ デフェンシンは、元来、血漿や乳由来の成分であり、ラットにおける急性毒性は認められなかった。また、これらの有効成分を飼料に含有させて、家畜や家禽等の骨形成を促進させたり、骨吸収を抑制させることもできる。

次に、実施例及び試験例を示して本発明を詳細に説明するが、これらは単に本発明の実施態様を例示するのみであり、本発明はこれらによって何ら限定されるものではない。

#### [試験例1]

##### (骨吸収抑制作用)

$\beta_2$ ミクログロブリン、ヒストン、補体第3成分、単球走化性タンパク質1、リゾチーム、リボヌクレアーゼ、プロトロンビン、チトクローム P-450、プラスミノゲン、トランスフェリン、トロンビン及びプラスミンについて骨吸収抑制作用を調べた。試験に供した各有効成分はいずれも市販の物を用いた。試験に供した各有効成分の由来及び各有効成分の最終濃度は表1記載の通りである。

生後10～20日齢のICR系マウスの長管骨を摘出し、軟組織を除去した後、5%牛胎児血清を含む $\alpha$ -MEM(Flow Laboratories社製)溶液中で骨を機械的に細切し、破骨細胞を含む全骨髓細胞を得た。この破骨細胞を含む全骨髓細胞を約 $2 \times 10^6$ 細胞になるように象牙片の上に撒き込み、5%牛胎児血清を含む $\alpha$ -MEM溶液でスポットした。2時間後、 $\beta_2$ ミクログロブリン、ヒストン、補体第3成分、単球走化性タンパク質1、リゾチーム、リボヌクレアーゼ、プロトロンビン、チトクローム P-450、プラスミノゲン、トランスフェリン、トロンビン及びプラスミンを、表1記載のそれぞれの最終濃度となるように、5%牛胎児血清を含む $\alpha$ -MEM溶液を加え、37℃で5日間培養し、既存の破骨細胞の骨吸収抑制活性を調べた。

骨吸収抑制作用の評価は、培養後、象牙片上の細胞を剥がしてヘマトキシリン染色し、PIASLA-555により画像解析して骨吸収窩(ピット)の数を測定した(瀬

野俣二ら, 研究テーマ別動物培養細胞マニュアル, pp. 199-200, 1993)。すなわち、ピット数が少ないということは、破骨細胞の活性が低下して骨吸収が抑制されたことを意味している。また、ピットアッセイで骨吸収抑制効果が示された物質は、動物実験でも骨吸収の抑制効果が示されており (Toba ら、Bone, vol.27, p. 403-408, 2000)、一般的にピットアッセイは骨吸収抑制効果を調べる上で適した実験系である。対照として、有効成分無添加のものをを用い、有効成分無添加のものの骨吸収活性を 100%としたときのそれぞれの骨吸収活性 (%) で表した。

その結果を表 1 に示す。

表 1

| 有効成分                                       | 濃度           | 相対活性 (%)    |
|--|--------------|-------------|
| 単球走化性タンパク質-1<br>(バイオテック社製)                 | 0.1 (pg/ml)  | 75.4 ± 33.8 |
|  | 1            | 45.9 ± 22.1 |
|  | 10           | 47.2 ± 11.3 |
| ヒストン H1/2A<br>(シグマ社製)                      | 10 (μg/ml)   | 79.1 ± 26.7 |
|  | 100          | 67.1 ± 26.6 |
| リゾチーム<br>(シグマ社製)                           | 25 (unit/ml) | 70.6 ± 23.7 |
|  | 250          | 42.4 ± 21.8 |
|  | 2,500        | 31.5 ± 14.4 |
| リボヌクレアーゼ<br>(ウシ精液)<br>(シグマ社製)              | 1 (μg/ml)    | 80.2 ± 18.0 |
|  | 10           | 45.6 ± 12.2 |
|  | 100          | 29.9 ± 15.5 |
| 補体第 3 成分<br>(ヒト)<br>(シグマ社製)                | 0.25 (μg/ml) | 93.1 ± 10.6 |
|  | 2.5          | 81.0 ± 25.0 |
|  | 25           | 61.7 ± 17.4 |
| β <sub>2</sub> ミクログロブリン<br>(ヒト)<br>(シグマ社製) | 0.1 (μg/ml)  | 80.9 ± 13.9 |
|  | 1            | 37.2 ± 16.4 |
|  | 10           | 9.7 ± 3.9   |

|                                  |     |               |      |   |      |
|----------------------------------|-----|---------------|------|---|------|
| プラスミノーゲン<br>(シグマ社製)              | 1   | ( $\mu$ g/ml) | 44.1 | ± | 37.9 |
|                                  | 10  |               | 13.8 | ± | 19.9 |
|                                  | 100 |               | 2.0  | ± | 2.8  |
| トランスフェリン<br>(フナコシ社製)             | 1   | ( $\mu$ g/ml) | 70.7 | ± | 36.6 |
|                                  | 10  |               | 51.9 | ± | 19.4 |
| チトクローム P-450<br>(ウサギ)<br>(シグマ社製) | 1   | ( $\mu$ g/ml) | 94.7 | ± | 10.2 |
|                                  | 10  |               | 83.0 | ± | 27.6 |
|                                  | 100 |               | 75.3 | ± | 16.3 |
| プロトロンビン<br>(シグマ社製)               | 0.1 | ( $\mu$ g/ml) | 62.0 | ± | 19.7 |
|                                  | 1   |               | 35.1 | ± | 16.0 |
|                                  | 10  |               | 25.1 | ± | 20.1 |
| プラスミン<br>(シグマ社製)                 | 1   | ( $\mu$ g/ml) | 54.1 | ± | 27.1 |
|                                  | 10  |               | 23.3 | ± | 19.1 |
|                                  | 100 |               | 5.0  | ± | 2.5  |
| トロンビン<br>(シグマ社製)                 | 1   | ( $\mu$ g/ml) | 55.0 | ± | 16.5 |
|                                  | 10  |               | 39.1 | ± | 13.0 |
|                                  | 100 |               | 26.3 | ± | 15.1 |

本発明の有効成分である $\beta_2$ ミクログロブリン、ヒストン、補体第3成分、単球走化性タンパク質1、リゾチーム、リボヌクレアーゼ、プロトロンビン、チトクローム P-450、プラスミノーゲン、トランスフェリン、プラスミン及びトロンビンを添加したものはいずれも、有効成分無添加のものに比べ骨吸収活性が抑制されており、顕著な骨吸収抑制作用を有することが判った。

#### [試験例2]

(骨芽細胞増殖作用)

プロトロンビン、チトクローム P-450、プラスミノーゲン、トランスフェリン、トロンビン及びプラスミンについて骨芽細胞増殖作用を調べた。試験に供した各

有効成分はいずれも市販のものを用いた。試験に供した各有効成分の由来及び各有効成分の最終濃度は表 2 記載の通りである。

マウス骨芽細胞 MC3T3-E1 細胞を 10%牛胎児血清を含む  $\alpha$  - MEM 培地 (Flow Laboratories 社製) で、 $2 \times 10^4$ /ml の細胞数で 96 穴プレートに播種し、5% CO<sub>2</sub> 存在下、37°C で 24 時間培養し、試験用培養細胞とした。そして、培地を牛胎児血清を含まない  $\alpha$  - MEM 培地に交換し、プロトロンビン、チトクローム P-450、プラスミノゲン、トランスフェリン、プラスミン及びトロンビンを表 2 記載のそれぞれの最終濃度となるよう培地に添加して、37°C で 18 時間培養した。これにブロモデオキシウリジン (BrdU) を用いたセルプロロフィレーションアッセイキット (アマシャムバイオサイエンス社製) で細胞増殖活性を調べた。対照として、有効成分無添加のものを用い、有効成分無添加のものの細胞増殖活性を 100% としたときのそれぞれの細胞増殖活性 (%) で表した。その結果を表 2 に示す。

表 2

| 有効成分                          | 濃度                | 相対活性 (%)     |
|-------------------------------|-------------------|--------------|
| プラスミノゲン<br>(シグマ社製)            | 0.5 ( $\mu$ g/ml) | 163 $\pm$ 21 |
|                               | 5                 | 235 $\pm$ 27 |
| トランスフェリン<br>(フナコシ社製)          | 0.5 ( $\mu$ g/ml) | 146 $\pm$ 17 |
|                               | 5                 | 235 $\pm$ 17 |
| チトクローム P-450 (ウサギ)<br>(シグマ社製) | 0.5 ( $\mu$ g/ml) | 172 $\pm$ 15 |
|                               | 5                 | 199 $\pm$ 22 |
|                               | 50                | 220 $\pm$ 27 |
| プロトロンビン<br>(シグマ社製)            | 0.1 ( $\mu$ g/ml) | 201 $\pm$ 11 |
|                               | 1                 | 353 $\pm$ 2  |
|                               | 10                | 379 $\pm$ 3  |
| プラスミン<br>(シグマ社製)              | 0.5 ( $\mu$ g/ml) | 141 $\pm$ 10 |
|                               | 5                 | 206 $\pm$ 23 |
| トロンビン                         | 0.1 ( $\mu$ g/ml) | 134 $\pm$ 9  |

|         |    |          |
|---------|----|----------|
| (シグマ社製) | 1  | 165 ± 11 |
|         | 10 | 176 ± 20 |

プロトロンビン、チトクローム P-450、プラスミノーゲン、トランスフェリン、プラスミン及びトロンビンを添加したものはいずれも有効成分無添加のものに比べ、マウス骨芽細胞 MC3T3-E1 増殖活性が濃度依存的に顕著に増加しており、骨芽細胞増殖作用を有することが判った。

### [試験例 3]

#### (骨芽細胞分化促進作用)

補体第 4 成分及び  $\beta$  デフェンシンの骨芽細胞分化促進作用を調べた。すなわち、ヒト由来前骨芽細胞 MG63 細胞を、10% 牛胎児血清を含む DMEM 培地 (Flow Laboratories 社製) を用いて、 $2 \times 10^4/\text{ml}$  の細胞数で 96 穴プレートに播種し、5%  $\text{CO}_2$  存在下、 $37^\circ\text{C}$  で 4 日間培養し、試験用培養細胞とした。そして、培地に 1% 牛胎児血清を含む培地に交換し、補体第 4 成分 (Complement component C4, C8195、シグマ社製) を最終濃度 0.1、1、及び  $10 \mu\text{g}/\text{ml}$  となるように、また、 $\beta$  デフェンシン ( $\beta$  デフェンシン 1 及び 2、株式会社ペプチド研究所製) を最終濃度 0.1、1、及び  $10 \mu\text{g}/\text{ml}$  となるように培地に添加して、 $37^\circ\text{C}$  で 5 日間培養した。培養上清を回収し、Procollagen Type I C-peptide EIA Kit (Takara MK101、宝酒造社製) にて培養上清中の I 型コラーゲン量を測定することにより骨芽細胞分化促進活性を調べた。コントロールとして、補体第 4 成分及び  $\beta$  デフェンシンが無添加のものを用了。コラーゲン産生量は、コントロールの I 型コラーゲン測定量に対するそれぞれのサンプルの I 型コラーゲン測定量の割合 (%) で表した。その結果を表 3 に示す。

表 3

| 最終濃度 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) | コラーゲン産生量 (%) |
|----------------------------------|--------------|
|----------------------------------|--------------|



|                  |     |        |
|------------------|-----|--------|
| コントロール (無添加)     | —   | 100±6  |
| 補体第 4 成分         | 0.1 | 138±7  |
|                  | 1   | 169±15 |
|                  | 10  | 161±9  |
| $\beta$ デフェンシン 1 | 0.1 | 127±11 |
|                  | 1   | 183±9  |
|                  | 10  | 197±18 |
| $\beta$ デフェンシン 2 | 0.1 | 134±9  |
|                  | 1   | 147±5  |
|                  | 10  | 177±14 |

---

補体第 4 成分及び  $\beta$  デフェンシンを添加した群はいずれもコントロール (補体第 4 成分及び  $\beta$  デフェンシン無添加) 群に比べ、I 型コラーゲン量が増加しており、骨芽細胞分化促進作用を有することが判った。

以上に示したように、[試験例 1] の試験結果から、 $\beta_2$  ミクログロブリン、ヒストン、補体第 3 成分、単球走化性タンパク質 1、リゾチーム、リボヌクレアーゼ、プロトロンビン、チトクローム P-450、プラスミノーゲン、トランスフェリン、トロンビン、プラスミン、及びこれらの酵素分解物は、破骨細胞による骨吸収を顕著に抑制すること、また、[試験例 2] の試験結果から、プロトロンビン、チトクローム P-450、プラスミノーゲン、トランスフェリン、トロンビン、プラスミン、及びこれらの酵素分解物は、破骨細胞による骨吸収を抑制するとともに骨芽細胞の増殖を促進することにより骨形成を促進すること、さらに、[試験例 3] の試験結果から、補体第 4 成分、 $\beta$  デフェンシン、及びこれらの酵素分解物は、骨芽細胞の分化を促進することにより骨形成を促進することが判る。

#### [実施例 1]

( $\beta_2$  ミクログロブリン含有骨吸収抑制剤)

既知の方法(Hoshi F., D. Nagai, S. Higuchi, T. Noso, A. Takahashi, S. Kawamura, Veterinary Immunology and Immunopathology, 53, 29-38, 1996. Purification of bovine beta2-microglobulin from colostrums and its complete amino acid sequence)に従い、ウシ初乳より $\beta_2$ ミクログロブリンを調製した。

すなわち、10 lのウシ初乳より遠心分離法により脱脂乳を得、1 N 塩酸で pH を 4 に調整し、凝集したカゼインを遠心分離で沈殿させた。20 g のカゼインを 5 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (PBS : pH 8.3) 1 l に溶解し、同緩衝液で平衡化したジエチルアミノエチル(DEAE)セルロース (DE-52:ワットマン社製) カラムに吸着させた。平衡化緩衝液で洗浄し、得られた画分を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)で分析し、12 kDa のタンパク質を含む画分を、限外濾過により濃縮し、5 mM PBS (pH 8.3) に対して 4℃で一晩透析した。濃縮液を 5 mM PBS (pH 8.3) で平衡化したセファデックス G-75 カラムからなるゲル濾過クロマトグラフィーに通した。12 kDa のタンパク質を含む画分を限外濾過で濃縮し、10 mM 酢酸アンモニウム溶液に対して透析した。これを凍結乾燥して本発明の有効成分である $\beta_2$ ミクログロブリン 12 mg を得た。この $\beta_2$ ミクログロブリン 12 mg を乳糖 120 mg と混合し、顆粒状に成型して本発明の骨吸収抑制剤を得た。

なお、ヒストン、補体第 3 成分、単球走化製タンパク質 1、リゾチーム、及びリボヌクレアーゼ、プロトンビン、チトクローム P-450、プラスミノーゲン、トランスフェリン、トロンビン、プラスミン、補体第 4 成分及び $\beta$ デフェンシンについても、上記 $\beta_2$ ミクログロブリンと同様の方法によりウシ初乳より調製することが可能である。

#### [実施例 2]

(ヒストン含有骨吸収抑制剤)

外皮を除去したサケの白子 (核酸 6%含有) 1 kg を水で洗浄した後、脱水し、さらに水 3 l を加えてホモゲナイザーでホモジネートを調製した。このホモジネートに 0.05 N 水酸化ナトリウム溶液を加えて pH を 6 に調整し、パパイン 20 g を加えて 35℃で 2 時間攪拌しながらタンパク質を分解した後、80℃で 30 分間保持して酵素を失活させて分解を終了した。分解終了後、遠心分離により沈殿を除

去し、得られた上清に対し 2.5 倍量の 95% エタノールを加えて DNA を沈殿させた。そして、含水エタノールを濾過して除去した後、凍結乾燥して、DNA 粉末からなる本発明の骨吸収抑制剤 65 g を得た。なお、この骨吸収抑制剤 1 g 中にはヒストン 425 mg が含まれていた。

### [実施例 3]

#### (プロトンビン含有骨形成促進及び骨吸収抑制剤)

既知の方法 (Hashimoto, N., T. Morita, and S. Iwanaga, J. Biochem. (Tokyo), vol. 97, p. 1347-1355, 1985) に準じ、ウシ血漿プロトンビンを調製した。すなわち、0.01 M になるようにクエン酸ナトリウムを加え、遠心分離によりウシ血漿を得た。10 l のウシ血漿に 0.1 M になるようにクエン酸バリウムをゆっくりと加え、緩やかに 1 時間攪拌した後、4,000rpm で 10 分間遠心分離した。得られた沈殿を 0.01 M 塩化バリウム、1mM ベンザミジン塩酸、0.02% アジ化ナトリウムを含む、0.1 M 塩化ナトリウム溶液で洗浄し、遠心分離した。この洗浄操作を 2 回繰り返した。バリウム沈殿を 40% 飽和硫酸 1 l で懸濁し、1 mM になるようにジイソプロリルフォスフォロフルオリデート (DFP) を加えて、1 晩攪拌した。5,000rpm で 30 分間、遠心分離を行ない、上清を得た。この上清に 67% 飽和度になるように飽和硫酸を加え、5,000rpm、30 分間の遠心分離により、沈殿を回収した。この沈殿を 0.2 M 塩化ナトリウム、1 mM DFP、1 mM ベンザミジン塩酸を含む 0.05 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.0) 100~150ml で溶解し、同じ緩衝液 20 l に対して 1 晩透析を行なった。不溶成分を遠心分離で除いた後、DEAE-セファデックス A50 クロマトグラフィーに供した。0.2 M の塩化ナトリウム、1 mM ベンザミジン塩酸を含む 0.05 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.0) で平衡化した DEAE-セファデックス A-50 カラム (200×100 mm) に供し、塩化ナトリウム濃度を 600 mM まで次第に高め、吸着したタンパク質を溶出した。プロトンビンは塩化ナトリウム濃度が約 300 mM となったところで溶出した。これを透析により脱塩し、次いで、0.1 M の塩化ナトリウム、1 mM ベンザミジン塩酸を含む 50mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 6.3) で平衡化したブルーセファロース CL-6B カラム (80×200mm) に供し、平衡化緩衝液で洗浄した後、塩化ナトリウム濃度を 4 M とした緩衝液で吸着したタ

ンパク質を溶出した。これを透析により脱塩し、凍結乾燥して本発明の有効成分であるプロトロンビン 1.0 g を得た。このプロトロンビン 1.0 g を乳糖 9.0 g と混合し、顆粒状に成型して本発明の骨形成促進及び骨吸収抑制剤を得た。

なお、 $\beta_2$ ミクログロブリン、ヒストン、補体第 3 成分、単球走化性タンパク質 1、リゾチーム、及びリボヌクレアーゼ、チトクローム P-450、プラスミノゲン、トランスフェリン、トロンビン、プラスミン、補体第 4 成分及び  $\beta$  デフェンシンについても上記プロトロンビンと同様の方法によりウシ血漿より調製することが可能である。

#### [実施例 4]

(プロトロンビン含有骨形成促進及び骨吸収抑制剤)

牛乳からプロトロンビンを含む画分を調製した。陽イオン交換樹脂の SP セファロース HP (アマシャムバイオサイエンス社製) 400 g を充填したカラム (直径 5 cm×高さ 30 cm) を脱イオン水で十分洗浄した後、このカラムに未殺菌脱脂乳 40 l (pH 6.7) を流速 25 ml/min で通液した。通液後、このカラムを脱イオン水で十分洗浄し、1.5M 塩化ナトリウムを含む 0.02M 炭酸緩衝液 (pH 7.0) で樹脂に吸着したタンパク質画分を溶出した。そして、この溶出液を逆浸透 (RO) 膜により脱塩して、濃縮した後、凍結乾燥してタンパク質画分粉末 21 g を得、本発明の骨形成促進及び骨吸収抑制剤とした。なお、このタンパク質画分粉末には、プロトロンビンが 0.01 重量%含まれていた。

#### [実施例 5]

(リボヌクレアーゼ含有骨吸収抑制剤)

リボヌクレアーゼ (シグマ社製) 50mg に、含水結晶ぶどう糖 93.5g、炭酸カルシウム 5g、シュガーエステル 1g、香料 0.5g を加え、混和した後、タブレット状に打錠して、本発明のリボヌクレアーゼ含有骨形成促進剤を製造した。

#### [実施例 6]

(チトクローム P-450 含有骨形成促進及び骨吸収抑制剤)

チトクローム P-450 (シグマ社製) 10mg に、含水結晶ぶどう糖 93.5g、炭酸カルシウム 5g、シュガーエステル 1g、香料 0.5g を加え、混和した後、タブレット状に打錠して、本発明のチトクローム P-450 含有骨形成促進及び骨吸収抑制剤を製造した。

#### [実施例 7]

(補体第 4 成分及び  $\beta$  デフェンシン含有骨形成促進剤)

S-Sepharose カラム (ファルマシア社製) に脱脂した牛乳 10 l を通液した後、20mM リン酸緩衝液 (pH7.0) で十分洗浄した。1.5M 食塩を含むリン酸緩衝液 (pH8.5) の比率を、1 時間で 100% まで上昇させながら吸着しているタンパク質をグラジエント溶出し、溶出時間 15 分の位置で補体第 4 成分 0.5mg を、20 分の位置で  $\beta$  デフェンシン 0.3mg を回収した。

このようにして得られた補体第 4 成分及び  $\beta$  デフェンシンは、そのまま本発明の骨形成促進剤として使用可能である。

#### [実施例 8]

(補体第 4 成分含有骨形成促進剤)

補体第 4 成分 (Complement component C4, C8195、シグマ社製) 1mg に、含水結晶ぶどう糖 93.4g、炭酸カルシウム 5g、シュガーエステル 1g、香料 0.5g を加え、混和した後、タブレット状に打錠して、本発明の補体第 4 成分含有骨形成促進剤を製造した。

#### [実施例 9]

( $\beta$  デフェンシン含有骨形成促進剤)

$\beta$  デフェンシン ( $\beta$ -Defensin-1, 4337-s、株式会社ペプチド研究所製) 1mg に、含水結晶ぶどう糖 93.4g、炭酸カルシウム 5g、シュガーエステル 1g、香料 0.5g を加え、混和した後、タブレット状に打錠して、本発明の  $\beta$  デフェンシン含有骨形成促進剤を製造した。

## [実施例 10]

(補体第4成分及び $\beta$ デフェンシン含有骨形成促進剤)

補体第4成分 (Complement component C4, C8195、シグマ社製) 1 mg、 $\beta$ デフェンシン ( $\beta$ -Defensin-2, 4338-s、株式会社ペプチド研究所製) 1mg に、含水結晶ぶどう糖 93.4g、炭酸カルシウム 5g、シュガーエステル 1g、香料 0.5g を加え、混和した後、タブレット状に打錠して、本発明の補体第4成分及び $\beta$ デフェンシン含有骨形成促進剤を製造した。

## [実施例 11]

( $\beta_2$ ミクログロブリン含有骨吸収抑制用飲料)

表4に示した配合で原料を混合した後、容器に充填し、加熱殺菌して、本発明の $\beta_2$ ミクログロブリン含有骨吸収抑制用飲料を製造した。

表 4

|                    |           |
|--------------------|-----------|
| 混合異性化糖             | 15.0(重量%) |
| 果汁                 | 10.0      |
| クエン酸               | 0.5       |
| $\beta_2$ ミクログロブリン |           |
| (実施例1)             | 0.05      |
| 香料                 | 0.1       |
| カルシウム              | 0.5       |
| 水                  | 73.85     |

## [実施例 12]

(リゾチーム含有骨吸収抑制用ビスケット)

表5に示した配合で原料を混合し、ドウを作成して成型した後、焙焼して、本発明のリゾチーム含有骨吸収抑制用ビスケットを製造した。

表 5

---

|               |             |
|---------------|-------------|
| 小麦粉           | 50.35 (重量%) |
| 砂糖            | 20.0        |
| 食塩            | 0.5         |
| マーガリン         | 12.5        |
| 卵             | 12.1        |
| 水             | 3.7         |
| 炭酸水素ナトリウム     | 0.1         |
| 重炭酸アンモニウム     | 0.2         |
| 炭酸カルシウム       | 0.5         |
| リゾチーム (シグマ社製) | 0.05        |

---

## [実施例 13]

(補体第 3 成分含有骨吸収抑制用ゼリー)

表 6 に示した配合で原料を混合した後、容器に充填し、加熱殺菌して、本発明の補体第 3 成分含有骨吸収抑制用ゼリーを製造した。

表 6

---

|                  |            |
|------------------|------------|
| 果糖               | 20.0 (重量%) |
| グラニュー糖           | 15.0       |
| 水あめ              | 5.0        |
| 寒天               | 1.0        |
| 補体第 3 成分 (シグマ社製) | 0.05       |
| 香料               | 0.11       |
| カルシウム            | 0.1        |

水 58.74

---

[実施例 14]

(ヒストン含有骨吸収抑制用プロセスチーズ)

表 7 に示した配合で原料を混合した後、85℃で乳化して、本発明のヒストン含有骨吸収抑制用プロセスチーズを製造した。

表 7

---

|                    |            |
|--------------------|------------|
| ゴーダチーズ             | 43.0 (重量%) |
| チェダーチーズ            | 43.5       |
| クエン酸ナトリウム          | 2.0        |
| ヒストン H1/2A (シグマ社製) | 0.05       |
| 乳由来カルシウム           | 1.0        |
| 水                  | 10.45      |

---

[実施例 15]

(単球走化性タンパク質 1 含有骨吸収抑制用ヨーグルト)

12 重量%還元脱脂乳を 90℃で 20 分間加熱殺菌した後、ラクトバチルス・アシドフィルス (*Lactobacillus acidophilus*) 及びストレプトコッカス・サーモフィルス (*Streptococcus thermophilus*) をそれぞれ接種し、2 種類のスターターカルチャーを得て両者を等量混合した。そして、表 8 に示した配合で原料を混合した後、発酵させて、本発明の単球走化性タンパク質 1 含有骨吸収抑制用ヨーグルトを製造した。

表 8

---

|  |  |
|--|--|
|  |  |
|--|--|

---



|                           |             |
|---------------------------|-------------|
| ヨーグルトミックス                 | 96.95 (重量%) |
| スターターカルチャー                | 3.0         |
| 単球走化性タンパク質 1<br>(バイオテック社) | 0.05        |

---

## [実施例 16]

( $\beta_2$ ミクログロブリン及び補体第3成分含有骨吸収抑制用乳児用調製粉乳)

表9に示した配合で原料を混合し、 $\beta_2$ ミクログロブリン及び補体第3成分含有骨吸収抑制用乳児用調製粉乳を製造した。

表 9

---

|                           |             |
|---------------------------|-------------|
| 脱脂粉乳                      | 75.85 (重量%) |
| 乳清タンパク質濃縮物                | 2.36        |
| 乳糖                        | 13.86       |
| ミネラル混合物                   | 0.32        |
| 脂溶性ビタミンを含む脂肪              | 7.53        |
| $\beta_2$ ミクログロブリン(シグマ社製) | 0.03        |
| 補体第3成分 (シグマ社製)            | 0.05        |

---

## [実施例 17]

(ヒストン含有骨吸収抑制用イヌ飼育用飼料)

表10に示した配合で原料を混合して、本発明のヒストン含有骨吸収抑制用イヌ飼育用飼料(ドッグフード)を製造した。

表 10

|                   |            |
|-------------------|------------|
| 大豆粕               | 12.0 (重量%) |
| 脱脂粉乳              | 13.95      |
| 大豆油               | 4.0        |
| コーン油              | 2.0        |
| パーム油              | 28.0       |
| トウモロコシでんぷん        | 15.0       |
| 小麦粉               | 9.0        |
| ふすま               | 2.0        |
| ビタミン混合物           | 9.0        |
| ミネラル混合物           | 2.0        |
| セルロース             | 3.0        |
| ヒストン H1/2A(シグマ社製) | 0.05       |

---

#### [実施例 18]

(トランスフェリン及びチトクローム P-450 含有骨形成促進及び骨吸収抑制用果汁飲料)

表 1 1 に示した配合で原料を混合した後、容器に充填し、加熱殺菌して、本発明のトランスフェリン及びチトクローム P-450 含有骨形成促進及び骨吸収抑制用果汁飲料を製造した。

表 1 1

---

|                      |           |
|----------------------|-----------|
| 混合異性化糖               | 15.0(重量%) |
| 果汁                   | 10.0      |
| クエン酸                 | 0.5       |
| トランスフェリン (フナコシ社製)    | 0.02      |
| チトクローム P-450 (シグマ社製) | 0.03      |
| 香料                   | 0.1       |
| カルシウム                | 0.5       |

|   |       |
|---|-------|
| 水 | 73.85 |
|---|-------|

## [実施例 19]

(プラスミノーゲン含有骨形成促進及び骨吸収抑制用ビスケット)

表 12 に示した配合で市販のプラスミノーゲンを用いて原料を混合し、ドウを作成して成型した後、焙焼して、本発明の骨形成促進及び骨吸収抑制用ビスケットを製造した。

表 12

|                  |           |
|------------------|-----------|
| 小麦粉              | 50.0(重量%) |
| 砂糖               | 20.0      |
| 食塩               | 0.5       |
| マーガリン            | 12.5      |
| 卵                | 12.1      |
| 水                | 4.05      |
| 炭酸水素ナトリウム        | 0.1       |
| 重炭酸アンモニウム        | 0.2       |
| 炭酸カルシウム          | 0.5       |
| プラスミノーゲン (シグマ社製) | 0.05      |

## [実施例 20]

(プラスミン含有骨形成促進及び骨吸収抑制用ビスケット)

表 13 に示した配合で市販のプラスミンを用いて原料を混合し、本発明の骨形成促進及び骨吸収抑制用ビスケットを製造した。

表 13

|     |           |
|-----|-----------|
| 小麦粉 | 50.0(重量%) |
| 砂糖  | 20.0      |

|              |      |
|--------------|------|
| 食塩           | 0.5  |
| マーガリン        | 12.5 |
| 卵            | 12.1 |
| 水            | 4.05 |
| 炭酸水素ナトリウム    | 0.1  |
| 重炭酸アンモニウム    | 0.2  |
| 炭酸カルシウム      | 0.5  |
| プラスミン（シグマ社製） | 0.05 |

#### [実施例 2 1]

（トランスフェリン含有骨形成促進及び骨吸収抑制用ゼリー）

表 1 4 に示した配合で原料を混合した後、容器に充填し、加熱殺菌して、本発明のトランスフェリン含有骨形成促進及び骨吸収抑制用ゼリーを製造した。

表 1 4

|                  |           |
|------------------|-----------|
| 果糖               | 20.0(重量%) |
| グラニュー糖           | 15.0      |
| 水あめ              | 5.0       |
| 寒天               | 1.0       |
| トランスフェリン（フナコシ社製） | 0.05      |
| 香料               | 0.11      |
| 炭酸カルシウム          | 0.45      |
| 水                | 58.39     |

#### [実施例 2 2]

（プロトロンビン含有骨形成促進及び骨吸収抑制用プロセスチーズ）

表 1 5 に示した配合で市販のプロトロンビンを用いて原料を混合した後、85℃で乳化して、本発明のプロトロンビン含有骨形成促進及び骨吸収抑制用プロセス

チーズを製造した。

表 1 5

|                |           |
|----------------|-----------|
| ゴーダチーズ         | 43.0(重量%) |
| チェダーチーズ        | 43.5      |
| クエン酸ナトリウム      | 2.0       |
| プロトンビン (シグマ社製) | 0.05      |
| 乳由来カルシウム       | 1.0       |
| 水              | 10.45     |

[実施例 2 3]

(トロンビン含有骨形成促進及び骨吸収抑制用プロセスチーズ)

表 1 6 に示した配合で市販のトロンビンを用いて原料を混合し、本発明のトロンビン含有骨形成促進及び骨吸収抑制用プロセスチーズを製造した。

表 1 6

|               |           |
|---------------|-----------|
| ゴーダチーズ        | 43.0(重量%) |
| チェダーチーズ       | 43.5      |
| クエン酸ナトリウム     | 2.0       |
| トロンビン (シグマ社製) | 0.05      |
| 乳由来カルシウム      | 1.0       |
| 水             | 10.45     |

[実施例 2 4]

(トランスフェリン含有骨形成促進及び骨吸収抑制用ヨーグルト)

12 重量%還元脱脂乳を 90℃で 20 分間加熱殺菌した後、ラクトバチルス・アシドフィルス (*Lactobacillus acidophilus*) 及びストレプトコッカス・サーモフィルス (*Streptococcus thermophilus*) をそれぞれ接種し、2 種類のスターターカルチャーを得て両者を等量混合した。そして、表 1 7 に示した配合で原料を混合した

後、発酵させて、本発明のトランスフェリン含有骨形成促進及び骨吸収抑制用ヨーグルトを製造した。

表 1 7

|                   |           |
|-------------------|-----------|
| ヨーグルトミックス         | 97.0(重量%) |
| スターターカルチャー        | 2.95      |
| トランスフェリン (フナコシ社製) | 0.05      |

## [実施例 2 5]

(プロトンビン含有骨形成促進及び骨吸収抑制用調製粉乳)

表 1 8 に示した配合で、実施例 3 で得られたプロトンビンを用いて原料を混合し、本発明の骨形成促進及び骨吸収抑制用乳児用調製粉乳を製造した。

表 1 8

|                |            |
|----------------|------------|
| 脱脂粉乳           | 75.85(重量%) |
| 乳清タンパク質濃縮物     | 2.36       |
| 乳糖             | 13.86      |
| ミネラル混合物        | 0.32       |
| 脂溶性ビタミンを含む脂肪   | 7.53       |
| プロトンビン (実施例 3) | 0.08       |

## [実施例 2 6]

(トロンビン含有骨形成促進及び骨吸収抑制用乳児用調製粉乳)

表 1 9 に示した配合で、市販のトロンビンを用いて原料を混合し、本発明の骨形成促進及び骨吸収抑制用乳児用調製粉乳を製造した。

表 1 9

|              |            |
|--------------|------------|
| 脱脂粉乳         | 75.85(重量%) |
| 乳清タンパク質濃縮物   | 2.36       |
| 乳糖           | 13.86      |
| ミネラル混合物      | 0.32       |
| 脂溶性ビタミンを含む脂肪 | 7.53       |
| トロンビン（シグマ社製） | 0.08       |

[実施例 27]

（プラスミノーゲン含有骨形成促進及び骨吸収抑制用イヌ飼育用飼料）

表 20 に示した配合で市販のプラスミノーゲンを用いて原料を混合して、本発明の骨形成促進及び骨吸収抑制用イヌ飼育用飼料（ドッグフード）を製造した。

表 20

|                 |           |
|-----------------|-----------|
| 大豆粕             | 12.0(重量%) |
| 脱脂粉乳            | 14.5      |
| 大豆油             | 4.0       |
| コーン油            | 2.0       |
| パーム油            | 28.0      |
| トウモロコシでんぷん      | 14.45     |
| 小麦粉             | 9.0       |
| ふすま             | 2.0       |
| ビタミン混合物         | 9.0       |
| ミネラル混合物         | 2.0       |
| セルロース           | 3.0       |
| プラスミノーゲン（シグマ社製） | 0.05      |

[実施例 28]

（プラスミン含有骨形成促進及び骨吸収抑制用イヌ飼育用飼料）

表 2 1 に示した配合で市販のプラスミンを用いて原料を混合して、本発明の骨形成促進及び骨吸収抑制用イヌ飼育用飼料（ドッグフード）を製造した。

表 2 1

|              |            |
|--------------|------------|
| 大豆粕          | 12.0 (重量%) |
| 脱脂粉乳         | 14.5       |
| 大豆油          | 4.0        |
| コーン油         | 2.0        |
| パーム油         | 28.0       |
| トウモロコシでんぷん   | 14.45      |
| 小麦粉          | 9.0        |
| ふすま          | 2.0        |
| ビタミン混合物      | 9.0        |
| ミネラル混合物      | 2.0        |
| セルロース        | 3.0        |
| プラスミン（シグマ社製） | 0.05       |

#### [実施例 29]

（補体第 4 成分及び  $\beta$  デフェンシン含有骨形成促進用乳飲料）

生乳を、均質圧力  $120\text{kg}/\text{cm}^2$  でホモゲナイズした後、 $75^\circ\text{C}$  で 15 秒間加熱殺菌した生乳に、補体第 4 成分（Complement component C4, C8195、シグマ社製）を、1 l 当たり 10mg となるように無菌下で添加し、100 ml 容量のガラス瓶に充填して本発明の補体第 4 成分及び  $\beta$  デフェンシン含有骨形成促進用乳飲料を製造した。

#### [実施例 30]

（ $\beta$  デフェンシン含有骨形成促進用乳飲料）

生乳を、均質圧力  $120\text{kg}/\text{cm}^2$  でホモゲナイズした後、 $75^\circ\text{C}$  で 15 秒間加熱殺菌した生乳に、 $\beta$  デフェンシン（ $\beta$ -Defensin-1, 4337-s、株式会社ペプチド研究所製）を、1 l 当たり 10mg となるように無菌下で添加し、100 ml 容量のガラス瓶



に充填して本発明の $\beta$ デフェンシン含有骨形成促進用乳飲料を製造した。

[実施例 3 1]

(補体第 4 成分含有骨形成促進用ゼリー)

果糖 20.0 (重量%)、グラニュー糖 15.0 (重量%)、水飴 5.0 (重量%)、寒天 1.0 (重量%)、香料 0.11 (重量%)、カルシウム 0.1 (重量%)、水 58.39 (重量%) の割合で原料を混合して、加熱滅菌した後、補体第 4 成分 (Complement component C4, C8195、シグマ社製) を、1 l 当たり 10mg となるように無菌下で添加して容器に充填し、本発明の補体第 4 成分含有骨形成促進用ゼリーを製造した。

[実施例 3 2]

( $\beta$ デフェンシン含有骨形成促進用乳児用調製粉乳)

脱脂乳 75.61 (重量%)、乳清タンパク質濃縮物 2.36 (重量%)、乳糖 13.86 (重量%)、ミネラル混合物 0.32 (重量%)、水溶性ビタミン混合物 0.32 (重量%)、脂溶性ビタミンを含む脂肪 7.53 (重量%) の割合で原料を混合して殺菌した後、濃縮し、噴霧乾燥して調製粉乳原料粉を製造した。これに、 $\beta$ デフェンシン ( $\beta$ -Defensin-2, 4338-s、株式会社ペプチド研究所製) を、1 kg 当たり 10mg となるように無菌下で添加、混合し、本発明の $\beta$ デフェンシン含有骨形成促進用乳児用調製粉乳を製造した。

[実施例 3 3]

(補体第 4 成分含有骨形成促進用ドッグフード)

大豆粕 12.0 (重量%)、脱脂粉乳 14.0 (重量%)、大豆油 4.0 (重量%)、コーン油 2.0 (重量%)、パーム油 28.0 (重量%)、トウモロコシ澱粉 15.0 (重量%)、小麦粉 9.0 (重量%)、ふすま 2.0 (重量%)、ビタミン混合物 9.0 (重量%)、ミネラル混合物 2.0 (重量%)、セルロース 3.0 (重量%)、の割合で原料を混合して殺菌し冷却後、補体第 4 成分 (Complement component C4, C8195、シグマ社製) を、1 l 当たり 10mg となるように無菌下で添加して成型し、本発明の補体第 4 成分含有骨形成促進用イヌ飼育用飼料 (ドッグフード) を製造した。

## 請 求 の 範 囲

1.  $\beta_2$ ミクログロブリン、ヒストン、補体第3成分、単球走化性タンパク質1、リゾチーム、リボヌクレアーゼ、プロトロンビン、チトクローム P-450、プラスミノゲン、トランスフェリン、トロンビン、プラスミン、補体第4成分、 $\beta$ デフェンシン、及びこれらの酵素分解物のいずれか1種以上を有効成分とする骨形成促進及び／又は骨吸収抑制剤。
2.  $\beta_2$ ミクログロブリン、ヒストン、補体第3成分、単球走化性タンパク質1、リゾチーム、リボヌクレアーゼ、プロトロンビン、チトクローム P-450、プラスミノゲン、トランスフェリン、トロンビン、プラスミン、及びこれらの酵素分解物のいずれか1種以上を配合した骨吸収抑制剤。
3. プロトロンビン、チトクローム P-450、プラスミノゲン、トランスフェリン、トロンビン、プラスミン、及びこれらの酵素分解物のいずれか1種以上を配合した骨形成促進及び骨吸収抑制剤。
4. 補体第4成分、 $\beta$ デフェンシン、及びこれらの酵素分解物のいずれか1種以上を配合した骨形成促進剤。
5.  $\beta_2$ ミクログロブリン、ヒストン、補体第3成分、単球走化性タンパク質1、リゾチーム、リボヌクレアーゼ、プロトロンビン、チトクローム P-450、プラスミノゲン、トランスフェリン、トロンビン、プラスミン、及びこれらの酵素分解物のいずれか1種以上を配合した骨吸収抑制用飲食品、医薬又は飼料。
6. プロトロンビン、チトクローム P-450、プラスミノゲン、トランスフェリン、トロンビン、プラスミン、及びこれらの酵素分解物のいずれか1種以上を配合した骨形成促進及び／又は骨吸収抑制用飲食品、医薬又は飼料。
7. 補体第4成分、 $\beta$ デフェンシン、及びこれらの酵素分解物のいずれか1種以上を配合した骨形成促進用飲食品、医薬又は飼料。

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/014761

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> A61K38/16, 38/36, 38/01, A61P19/08, 19/10, A23L1/305, A23K1/16

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> A61K38/16, 38/36, 38/01, A61P19/08, 19/10, A23L1/305, A23K1/16

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

MEDLINE (STN), BIOSIS (STN), CAPLUS (STN), EMBASE (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| X         | JP 03-099022 A (Teijin Ltd.),<br>24 April, 1991 (24.04.91),<br>Full text; particularly, Claims; page 2, lower<br>left column, lines 1 to 4; examples<br>(Family: none)                    | 1, 2, 5               |
| X         | JP 05-132426 A (Takeda Chemical Industries,<br>Ltd.),<br>28 May, 1993 (28.05.93),<br>Full text; particularly, Claims; Par. No. [0006]<br>& EP 499242 A1 & CA 2061211 A<br>& DE 69211723 A | 1-3, 5, 6             |

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
04 January, 2005 (04.01.05)

Date of mailing of the international search report  
25 January, 2005 (25.01.05)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/014761

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
| X         | WO 2002/05836 A2 (THE BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEMS),<br>24 January, 2002 (24.01.02),<br>Full text; particularly, Claims<br>& JP 2004-503596 A & EP 1301196 A2<br>& US 2002/128101 A1 & CA 2416487 A | 1-3, 5, 6             |
| X         | JP 10-505592 A (Novo Nordisk A/S),<br>02 June, 1998 (02.06.98),<br>Full text; particularly, Claims; page 5, lines<br>9 to 14; page 6, lines 5 to 9; Fig. 6<br>& WO 96/06532 A1 & EP 778733 A1<br>& DE 69519675 A         | 1, 2, 4, 5, 7         |

BEST AVAILABLE COPY

|  |   |                  |
|--|---|------------------|
| A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))<br>Int. Cl <sup>7</sup> A61K38/16, 38/36, 38/01, A61P19/08, 19/10,<br>A23L1/305, A23K1/16  |   |                  |
| B. 調査を行った分野<br>調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))<br>Int. Cl <sup>7</sup> A61K38/16, 38/36, 38/01, A61P19/08, 19/10,<br>A23L1/305, A23K1/16  |   |                  |
| 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの   |   |                  |
| 国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)<br>MEDLINE (STN), BIOSIS (STN), CAPLUS (STN), EMBASE (STN)   |   |                  |
| C. 関連すると認められる文献  |   |                  |
| 引用文献の<br>カテゴリー*  | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示   | 関連する<br>請求の範囲の番号 |
| X  | JP 03-099022 A (帝人株式会社) 1991.04.24<br>全文、特に特許請求の範囲、第2頁左下欄1~4行、実施例参照<br>(ファミリーなし)                                | 1, 2, 5          |
| X  | JP 05-132426 A (武田薬品工業株式会社) 1993.05.28<br>全文、特に特許請求の範囲、段落【0006】参照<br>&EP 499242 A1 &CA 2061211 A &DE 69211723 A | 1-3, 5, 6        |
| <input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。  |   |                  |
| * 引用文献のカテゴリー<br>「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの<br>「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの<br>「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)<br>「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献<br>「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献<br>「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの<br>「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの<br>「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの<br>「&」 同一パテントファミリー文献 |   |                  |
| 国際調査を完了した日<br>04.01.2005   | 国際調査報告の発送日<br>25.1.2005   |                  |
| 国際調査機関の名称及びあて先<br>日本国特許庁 (ISA/J P)<br>郵便番号100-8915<br>東京都千代田区霞が関三丁目4番3号  | 特許庁審査官 (権限のある職員)<br>榎本 佳予子  | 4 P 9638         |
| 電話番号 03-3581-1101 内線 3492  |   |                  |

| C (続き) . 関連すると認められる文献 |   |                  |
|-----------------------|---|------------------|
| 引用文献の<br>カテゴリー*       | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示   | 関連する<br>請求の範囲の番号 |
| X                     | WO 2002/05836 A2 (THE BOARD OF REGENTS, THR UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEMS) 2002.01.24<br>全文、特に特許請求の範囲参照<br>&JP 2004-503596 A &EP 1301196 A2 &US 2002/128101 A1<br>&CA 2416487 A | 1-3, 5, 6.       |
| X                     | JP 10-505592 A (ノボ ノルディスク アクティーゼルスカブ)<br>1998.06.02<br>全文、特に特許請求の範囲、第5頁9～14行、第6頁5～9行、<br>図6参照<br>&WO 96/06532 A1 &EP 778733 A1 &DE 69519675 A                                 | 1, 2, 4, 5, 7    |